



TITLE:

ダイズのハスモンヨトウ抵抗性機構の化学的基盤(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

中田, 隆

CITATION:

中田, 隆. ダイズのハスモンヨトウ抵抗性機構の化学的基盤. 京都大学, 2019, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2019-03-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21834>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要約は2020-01-01に公開

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	中田 隆
論文題目	ダイズのハスモンヨトウ抵抗性機構の化学的基盤		
(論文内容の要旨)			
<p>ハスモンヨトウ <i>Spodoptera litura</i> はダイズ <i>Glycine max</i> (L.) Merrill の主要な害虫である。被害低減にはハスモンヨトウ抵抗性のダイズ品種の利用が効果的であるが、現在栽培されている育成品種は抵抗性を持たない。そこで抵抗性を付与した良質多収品種の開発が必要である。一方、これまでに抵抗性品種から複数の抵抗性 QTL が特定されたが、それらを導入したダイズは圃場で十分な抵抗性を示さない。実用品種の作出には、ダイズの遺伝的基盤に加えて、ダイズ-ハスモンヨトウ幼虫の相互作用の観点を取り入れて、抵抗性機構の化学的基盤を理解することが重要である。そこで本研究では、抵抗性品種の食害に伴うハスモンヨトウ幼虫の行動や生理の変化および食害を受けたダイズにおける化学的な誘導応答の解析を通じて、抵抗性の要因を明らかにすることを目的とした。実験には抵抗性品種としてヒメシラズ・IAC100、感受性品種としてエンレイ・タマホマレを用いた。</p> <p>第 1 章の序論に続く第 2 章では、ダイズの持つ非選好性がハスモンヨトウ幼虫の摂食行動に与える影響を検討した。まず、幼虫によるダイズ葉の摂食量を経時的に定量する独自手法を開発した。この手法を用いて、剃刀で葉の表面の毛茸を除去した抵抗性品種の摂食量を測定したところ、除去しない場合と比較して摂食量が有意に増加しないことから、毛茸の有無が直接的な非選好性の要因ではないと示した。そこで、化学的な要因に注目した。抵抗性・感受性品種を溶媒抽出して LC/MS で分析し、成分組成を PCA 解析により網羅的に比較した。これにより、抵抗性品種に多く含まれる成分 3 種を見出し、それぞれ単離・精製して NMR で構造を解析した。その結果、3 種をフラボノール配糖体 kaempferol 3-(2^{Gal}-glucosylrobinoside)、kaempferol 3-(2^G-glucosylrutinoside)、kaempferol 3-(2^{Gal}-rhamnosylrobinoside) と同定した。続いてハスモンヨトウ幼虫に対する摂食阻害活性を検討し、kaempferol 3-(2^G-glucosylrutinoside) と kaempferol 3-(2^{Gal}-rhamnosylrobinoside) に活性を認めた。さらに、これらの化合物の葉中の分布を分析し、いずれも毛茸に蓄積して傷害により葉表面に滲出することを明らかにした。また毛茸の柔らかさを測定し、抵抗性品種の毛茸は、特にその先端が顕著に柔らかいことも見出した。以上より、抵抗性品種では摂食阻害活性を持つフラボノール配糖体が葉の柔らかい毛茸に蓄積し、ハスモンヨトウ幼虫の食害で滲出したフラボノール配糖体が幼虫の食害を妨げることが、非選好性の機構と推定した。</p> <p>第 3 章では、ダイズの持つ抗生性がハスモンヨトウ幼虫の生理に与える影響を検討した。まず抵抗性品種を摂食した幼虫の糞の排出速度を測定したところ、感受性品種を摂食した場合に比べて排出が遅くなり、腸管の機能性に変化が生じていることが明らかになった。さらに chitin 定量法を独自に開発し、抵抗性品種を摂食した幼虫において囲食膜中の chitin 量が有意に少ないことを示した。これらの結果に関与する要因として、幼虫の中腸組織にある trehalase-2 に着目した。まず、抵抗性品種の葉の</p>			

粗抽出物に *in vitro* での trehalase-2 阻害活性を認め、これを指標にして阻害活性物質を単離・精製した。構造を NMR で解析し、2,3,4-trihydroxy-2-methylbutanoic acid を同定した。また旋光度から、単離した試料は (2*S*, 3*S*) 体と (2*R*, 3*R*) 体の混合物と考えられた。そこで両エナンチオマーを有機合成し、酵素阻害活性を調べたところ、(2*S*, 3*S*) 体が強い阻害活性を示した。さらに、(2*S*, 3*S*) 体をハスモンヨトウ幼虫に摂食させると、生育が阻害され、囲食膜中 chitin 量が減少した。また、(2*S*, 3*S*) 体の含有量は感受性品種より抵抗性品種で有意に多かった。以上より、trehalase-2 阻害活性を示す (2*S*, 3*S*)-2,3,4-trihydroxy-2-methylbutanoic acid を摂食するとハスモンヨトウ幼虫の囲食膜中 chitin 量が減少し、囲食膜が脆化した結果、中腸の消化機能が損なわれることが抗生性の機構と推定した。

第 4 章では、ハスモンヨトウ幼虫由来エリシターによるダイズ葉での化学的な誘導応答を調べた。安定同位体トレーサー法により、幼虫吐き出し液中のエリシターが isoflavone 類の *de novo* 生合成を誘導することを明らかにした。さらに、吐き出し液に含まれる FACs (fatty acid-amino acid conjugates) のうち、*N*-linolenoyl-L-glutamine と *N*-linoleoyl-L-glutamine を有機合成し、isoflavone 類の *de novo* 誘導活性を評価した。これにより、isoflavone 配糖体は FACs で誘導される一方、アグリコンは他の未知エリシターにより誘導されることが示唆された。またトレーサー法により得られた安定同位体 isoflavone について、MS/MS フラグメンテーション解析を行った。これにより、isoflavone および 5-hydroxyisoflavone に特異的なフラグメントイオンの開裂様式を推定した。幼虫食害に対するダイズの化学的な誘導応答を解析する場合において、安定同位体トレーサー法が効果的であることおよび代謝物の MS/MS 開裂様式の解明が必要であることを示した。

第 5 章では、本論文で明らかになった複数の抵抗性機構の意義について、ハスモンヨトウ抵抗性品種の育種の観点から考察した。また、ハスモンヨトウの行動・生理の理解に基づいた抵抗性機構解明の重要性を述べ、将来的な研究の発展性について論じた。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は 1 頁を 3 8 字×3 6 行で作成し、合わせて、3, 0 0 0 字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、4 0 0 ～ 1, 1 0 0 words で作成し
審査結果の要旨は日本語 5 0 0 ～ 2, 0 0 0 字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

ハスモンヨトウはダイズの難防除害虫の一種であり、被害を低減するため、抵抗性品種の開発が模索されてきた。しかし圃場での栽培で発揮される実用的な抵抗性には複数の要因が関与すると考えられ、有効な抵抗性品種の開発には昆虫と植物の相互作用の詳細な解析が欠かせない。本論文では、ダイズとハスモンヨトウの相互作用について、ダイズがハスモンヨトウの行動・生理に及ぼす影響およびハスモンヨトウの食害によるダイズの誘導応答を解析し、ダイズが持つハスモンヨトウ抵抗性の化学的基盤を明らかにした。評価できる点は以下の通りである。

1. ハスモンヨトウ幼虫の摂食行動を簡便に継時定量解析できる手法を独自に確立し、これを用いて毛茸に含まれる摂食阻害物質 kaempferol 3-(2^G-glucosyl-rutinoside) と kaempferol 3-(2^{Gal}-rhamnosylrobinoside) を同定した。
2. 摂食によるハスモンヨトウ幼虫の消化管機能の変化に着目した実験から、中腸の trehalase-2 を阻害するダイズ成分として (2*S*, 3*S*)-2,3,4-trihydroxy-2-methylbutanoic acid を同定した。またその不斉合成を達成し、本成分が中腸の囲食膜に含まれる chitin 量を減少させることを示した。
3. ハスモンヨトウ幼虫由来エリシターの FACs がダイズにおける isoflavone 類の *de novo* 生合成を誘導することを明らかにした。またその過程で、isoflavone に特異的な MS/MS 開裂様式の機構を推定した。
4. ダイズの抵抗性が、単一遺伝子の作用では説明できない複数の要因によって成立していくことを化学的アプローチにより示した。

以上のように、本論文はダイズのハスモンヨトウ抵抗性機構について、ハスモンヨトウの行動・生理に変化をもたらす抵抗性成分とその作用機構およびダイズの誘導応答に関わる新たな知見を与えるものであり、化学生態学・農薬化学・育種学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 31 年 2 月 14 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から 3 ヶ月以内）